PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5:

207K 7/08, A61K 39/36

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 94/10194

G01N 33/68

A2 (43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

11. Mai 1994 (11.05.94)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/AT93/00163

(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1993 (25.10.93)

(74) Anwälte: ITZE, Peter usw.; Amerlingstr. 8, A-1061 Wien

(30) Prioritätsdaten:

A 2125/92 A 43/93

27. Oktober 1992 (27.10.92) ΑT

14. Januar 1993 (14.01.93) AT (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-MAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELL-SCHAFT M.B.H.[AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EBNER, Christof [AT/ AT]; St. Elisabethplatz 4/13, A-1040 Wien (AT). FER-REIRA, Fatima [BR/AT], De Quergasse 6/3, A-1170 Wien (AT). SCHENK, Siegfried (AT/AT); Schönlatern-gasse 8/33, A-1010 Wien (AT). SZEPFALUSI, Zsolt [AT/AT]; Gaullachergasse 10, A-1160 Wien (AT). VA-LENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT). BREITENBACH, Michael [AT/AT]; Helfertgasse 44, A-1120 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). RUMPOLD, Helmut [AT/AT]; Buchleitengasse 8/3, A-1180 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Hohe Wandstrasse 40, A-2364 Marianenzersdorf (AT).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: MOLECULE FRAGMENTS (PEPTIDES) OF THE MAIN ALLERGENS CONTAINED IN THE POLLEN OF TREES OF THE FAGALES ORDER

(54) Bezeichnung: MOLEKULFRAGMENTE (PEPTIDE) DER HAUPTALLERGENE DER POLLEN VON BÄUMEN DER ORDNUNG FAGALES

(57) Abstract

The invention concerns the T-cell epitope of a 17 kD protein present as the main allergen contained in the pollen of trees of the Fagales order, in particular birches, hazels and alders, or generated by genetic engineering as a recombinant protein. Because of the high degree of affinity between said trees, their respective 17 kD proteins are also highly homologous. These proteins are designed as Bet v I, Cor a I and Aln g I in the international literature and cause tree pollen allergies in predisposed persons (allergic patients). The peptides derived from the main allergens (major allergens), in particular Bet v I, are suitable for diagnosing tree pollen allergy and are capable of stimulating (causing the proliferation, the cytokine production) or blocking T-cells of the patients in vitro and in vivo in an allergen-specific manner, or to provoke tolerance to the allergen specific T-cells:

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf T Zell Epitope eines 17 kD Proteins, das als Hauptallergen der Baumpollen der Order Fagales, insbesondere Birke, Hasel und Erle in der Natur vorkommt oder auf gentechnologischem Wege als rekombinantes Protein erzeugt wird. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der genannten Bäume besteht eine hohe Homologie auch der jeweiligen 17 kD Proteine, die gemäß der internationalen Literatur als Bet v I, Cor a I und Aln g I bezeichnet werden und in disponierten Personen (Allergikern) Baumpollenallergien hervorrufen. Die von den Hauptallergenen (major allergens), insbesondere Bet v I abgeleiteten Peptide eignen sich für die Diagnose der Baumpollenallergie und sind imstande T Zellen der Patienten in vitro wie in vivo allergen-spezifisch zu stimulieren (Proliferation, Zytokinproduktion) oder zu blockieren bzw. zu einer Toleranz der allergenspezifischen T Zellen zu führen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
ΑU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	CE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BC	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neusceland
BJ	Benin	16	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	1T	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CP	Zentrale Afrikanische Republik	KC	Kirgisistan	SD	Sudan
CC	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakenien
CI	Côle d'Ivoire	ΚZ	Kasachstan	SK	Slowakci
CM	Kamerun	LI	Licchtenstein	SN	Senega)
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
cs	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanicn	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

WO 94/10194 PCT/AT93/00163

Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der Ordnung Fagales

1

5 1. Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der Ordnung Fagales, insbesondere von Birken, Haseln und Erlen. Im speziellen bezieht sich die Erfindung auf von Baumpollen-Allergenen 10 abgeleitete Peptidsequenzen, die im Rahmen der pathologischen Immunantwort für die überschießende IgE Antikörperproduktion der Baumpollenallergiker verantwortlich zu machen sind. Diese Peptide können sowohl innerhalb einer verbesserten Allergiediagnostik als auch in vitro und in vivo zur Induktion einer Immuntoleranz bzw. Anergie von allergenspezifischen T Zellen Verwendung finden.

15

2. Umfeld der Erfindung

Epidemiologische Studien zeigen, daß in den westlichen Industrieländern eine ständige Zunahme von Typ I Allergien (allergische Rhinitis, allergische 20 Conjunctivitis, allergisches Asthma) zu beobachten ist (1,2). Insbesonders kommt es durch den Pollenflug im Frühling und Frühsommer in den Ländern der nördlichen Hemisphäre zu den genannten IgE-bedingten Erkrankungen. Proteine von Pollen der Bäume der Order Fagales, speziell von Pollen der Birke, der Hasel, der Erle, der Hainbuche, der Eiche und der Edelkastanie können im Frühjahr für das Auftreten der 25 genannten Allergien verantwortlich gemacht werden (3). Wenigstens 30-40% der Pollenallergien sind durch diese Pollenallergene hervorgerufen. Diese Allergien werden durch IgE Antikörper ausgelöst, die Effektorzellen (Mastzellen der Schleimhäute und des Bindegewebes, basophile Granulozyten des Blutes) besetzen und bei Verbindung mit Pollenallergen zu einer Freisetzung von Entzündungsstoffen 30 führen (4). Die Bildung solcher IgE Antikörper erfolgt durch B Lymphozyten, die in Kooperation mit T Lymphozyten über deren lösliche Faktoren bzw. Zellkontakte

(5). Αm Beginn dieser Immunantwort stehen stimuliert werden allergenpräsentierende Zellen (Monozyten, Makrophagen, Dendritenzellen etc.), die die Allergene aufnehmen, intrazellulär verarbeiten, um sie dann in Form von Molekülen des zusammen mit Peptiden hochimmunogenen 5 Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) T Lymphozyten darzubieten (6). Demnach spielen T Zellen innerhalb der IgE Antwort eine ganz bedeutende Rolle, da sie in allergenspeziflscher Weise sowohl durch Zellkontakt als auch durch die Produktion von Zytokinen zur Aktivierung der B Lymphozyten führen und die überschießende IgE Produktion der B Zellen, bzw. der sich aus diesen entwickelnden 10 Plasmazellen einleiten.

Unter Verwendung von Pollenextrakten und gereinigten Allergenen sind in den letzten Jahren zahlreiche Teste für die Diagnose IgE bedingter Allergien entwickelt worden. Diese Testsysteme umfassen RIA (Radioimmunassay), IRMA (Immunradiometrische Assay), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) LIA 15 (luminescence immunoassay), Immunoblots, Histamine-release-assay, T Zell Proliferationsassay und andere. Durch den Einsatz von allergenabgeleiteten gentechnologisch hergestellten oder synthetisierten Peptiden, die T Zell Erkennungsarealen entsprechen, kann in Zukunft sicherlich eine Verbesserung der genannten Testsysteme erreicht werden.

- Seit Jahrzehnten werden IgE bedingte Allergien, insbesondere Pollenallergien durch die sogenannte Hyposensibilisierung therapiert (7). Diese Therapie besteht in der Zufuhr von Allergenextrakten in Form von Injektionen oder peroraler Applikation in wässriger Form als Tropfen oder als Nasenspray bzw. Augentropfen, in steigender Dosierung bis zur Erreichung einer Erhaltungsdosis über mehrer Jahre.
- 25 Effekte dieser Immuntherapie sind das Erreichen einer Toleranz gegenüber den eingesetzten Allergenen, was sich klinisch in einer deutlichen Abnahme der angeführten Krankheitssymptome bzw. in einer vollkommenen Symptomlosigkeit äußert (8). Da derzeit bei dieser Art der Behandlung immunogene Allergenpräparationen eingesetzt werden, sind Nebenwirkungen sehr häufig zu
- 30 beobachten. Bei Einsatz von allergenabgeleiteten, aber nichtanaphylaktisch wirkenden Peptiden, könnten risikolos höhere Dosen gegeben und damit eine

wesentliche Verbesserung der Hyposensibilisierung erreicht werden. Weiters bestehen aufgrund unserer Untersuchungen deutliche Hinweise für spezielle T Zell Bindungsareale auf Allergenen, sogenannte Epitope, die einerseits die Fähigkeit besitzen T Lymphozyten zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen (siehe 5 Tabelle 1, in welcher ein Beispiel für T Zellklonreaktivität für die einzelnen Peptide angeführt ist), andererseits - in hohen Dosen - diese Zellen auch in einen Zustand der Toleranz bzw. Nicht-Reaktivität (Anergie) zu versetzen (9).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit allergenabgeleitete Peptidsequenzen von Bet v 1, dem Hauptallergen von Birkenpollen, welche die Fähigkeit haben 10 Bet v I spezifische T Zellen bzw. Zellklone von Birkenpollen-Allergikern in der oben genannten Art zu beeinflußen. Aufgrund der hohen Homologie der "major allergens" Bet v I, Cor a I und Aln g I (10) sind die genannten Peptide weiters in der Lage in gleicher Weise T Zellen bzw. Zellklone von Patienten, die auf Hasel- oder Erlenpollen oder Pollen von anderen Bäumen der Order Fagales reagieren, in der 15 oben genannten Weise zu beeinflußen (siehe Tabelle 1, welche ein Beispiel für die Kreuzreaktivität der entsprechenden T Zellklone bezüglich der Allergene Bet v I, Cor a I und Aln g I wiedergibt). Das bedeutet, daß eine Therapie mit solchen, aufgrund einer Homologie über 75%, kreuzreaktiven Peptiden geeignet ist eine Toleranz in Baumpollenallergikern zu erzeugen.

Tabelle 1: Kreuzreaktivität Bet v I-spezifischer Zellklone mit Cor a I und Aln g 1

	KLON	HC26	SS6	DF16	HC5	FS5	AS27	BE15	
25	NEG KO	0,5	0,5	0,4	0,2	0,03	0,1	0,06	•
	BET v I nat	11,9	9,03	32,2	90,4	1,43	5,7	66,8	
	BET v I rec	6,5	5,77	30	87,7	5,24	4,5	75,7	
	COR a I	ND	12,6	23,1	57,4	ND	10,4	65,9	
30	ALN g I	ND	9,46	9,2	28,5	ND	9,3	28,7	

WO 94/10194 PCT/AT93/00163

4

Werte sind cpm (counts per minute) x 1000

ND: Experiment nicht durchgeführt

3. Beispiele

5

3 1. Primärantwort der T-Lymphozyten von Birkenpollenallergikern:

Blutabnahme erfolgte bei atopischen Patienten (typische Anamnese für eine Birkenpollenallergie, positiver Hauttest mit Birkenpollenallergenen, RAST-Klasse 3-5 mit Birkenpollenallergenen). Die Gewinnung von mononukleären Leukozyten 10 (PBMC) aus heparinisiertem Blut erfogte mittels Gradientenzentrifugation (Ficoll). Lymphozytenaktivierung wurde fogendermaßen durchgeführt: Ansatz von 100.000 Zellen/Napf in 96-näpfigen Kulturplatten mit verschiedenen Bet v I Konzentrationen (zwischen 50 und 5 ug/ml). 5 Tage später Zugabe von 3H-Thymidin für weitere 12 Stunden, dann Auswertung der Lymphozytentransformation.

15

3.2. Allgenspezifische T 7ellinien:

500.000 PBMC wurden anschließend in 2 ml Medium (24-näpfige Kulturplatte) in Anwesenheit von Bet v I in optimaler Konzentration (im obengenannten Vorversuch bei jedem einzelnen Patienten ermittelt) kultiviert. Die stimulierbaren 20 T-Zellen (mit Bet v I Spezifität) exprimierten vermehrt Interleukin-2 (IL-2) Rezeptoren an ihrer Oberfläche und begannen sich zu Blasten zu transformieren und zu teilen. Diese Blastentransformation wurde nach 5 Tagen durch die Zugabe von IL-2 unterstützt. Nach 10-14 Tagen dominierten Bet v I speziflsche Zellen in der Kultur. Diese wurden dann nach einem "limiting dilution" Verfahren auf 0,3 Zellen 25 pro Napf in Anwesenheit von 100.000 bestrahlten PBMC als "feeder-Zellen" in 96-näpfigen Platten auskloniert. Wachsende Kulturen wurden expandiert, auf ihre Spezifltät überprüft, mittels Durchflußzytometrie (FACScan) phänotypisiert und dann den geplanten Untersuchungen zugeführt.

30 3.3. Charakterisierung von T Zellepitopen des Bet v I Moleküls:

Die Bindungsareale der Bet v I-spezifischen T Zellklone am Allergen wurden in Proliferationsversuchen (3H-ThymidinEinbau) durch die Zugabe von jeweils einem Peptid ermittelt. Zu diesem Zweck wurde die Reaktivität auf Dodekapeptide getestet, die entsprechend der Aminosäurensequenz von Bet v I synthetisiert worden 5 waren. Diese Peptide überspannten jeweils 10 gemeinsame Aminosäuren und überlappten mit den zwei in der Sequenz folgenden. Im einzelnen wurde so vorgegangen: im ersten Durchgang wurden jeweils 20.000 Zellen des Bet v I spezifischen Klons mit autologen bestrahlten PBMC (Antigen-präsentierende Zellen) und jeweils 1 µg Peptid der eingesetzten 75 Peptide pro Napf inkubiert. Als 10 Positivkontrolle dienten gereinigte native und rekombinante Bet v I Moleküle (2 µg/Napf) sowie Werte einer maximalen T Zellstimulation durch die Kombination von Phytohämaglutinin A und IL-2. Als Negativkontrolle wurden Ansätze verwendet, die in den Näpfen nur Klonzellen allein bzw. Klonzellen mit autologen bestrahlten feeder Zellen ohne Zugabe von Antigen bzw. Peptid inkubiert worden waren. Jene Peptide, 15 die eine starke Proliferation des Klons hervorriefen, wurden in einem zweiten Proliferationsversuch in dreifach-Ansätzen getestet, um die Spezifität des Klons für die entsprechende Aminosäuresequenz zu sichern.

Auf diese Weise wurden 30 Bet v I-spezifische T Lymphozytenklone von 9
Patienten gewonnen, das heißt, daß von jedem Patienten mehrere Klone auf
20 Peptidreaktivität getestet werden konnten. Folgende Peptide führten zu einer
Reaktivität der als repräsentative Beispiele genannten T Zellklone (siehe Tabelle 2):

25	Aminosäuren Position in der Bet v I Sequenz:	Bezeichnung der Klone
GVFNYETETTSVIPAA	1 - 16	HC26
TTSVIPAARLFKAFIL	9-26	SS6
DNLFPKVAPQAISSVE	29-44	SAZ53/III
³⁰ PQAISSVENIEGNG	35-48	HC3/III

WO 94/10194 PCT/AT93/00163

	6	
GPPFKYVKDRVDEVDHTN	61 -76	DF16
DAWNERSNYSVIEGOP	75-90	HC5
YSVIEGGPIGDTLEKI	84-97	FS5
5 DTLEKISNEIKIVATPDG	93-110	HC2/III
GSILKISNKYHTKGDH 8	111-126	AS2 7
ETLLRAVESYLLAHSDAYN *	141-159	BE15

7

Tabelle 2: Reaktivität Bet v I-spezifischer Lymphozytenklone. Je ein repräsentatives Experiment mit einem Klon pro Epitop ist angeführt

BE15	0,14	15'8	9'01	141 - 159	10,2
AS27	0,1	5,7	4,5	111 - 126	2,46
HC2III	6'0	78	Q.	84 bis 97 93 bis 110 1111 - 126 141 - 159	78,6
FSS	0,03	5,24	1,43	84 bis 97	1,73
HCS	90,0	69,3	1,89	29 bis 44 35 bis 48 61 bis 76 75 bis 90	34,4
DF16	91'0	9'15	20,7	61 bis 76	48,8
НСЗІП	1,2	31,9	29,6	35 bis 48	1,62
SAZ53111	3,1	41,1	52,9		28,9
\$86	6,0	9,03	5,77	9 bis 26°	30
HC26	5'0	6'11	6,5	1 bis 16	47,2
KLON	NEG KO	BET v 1 nat	BET v I rec	Aminosäuren	EPITOP

Werle entsprechen cpm (counts per minute) x 1000

ND: Experiment wurde nicht durchgeführt

Internationaler Ein-Buchstaben-Kode für Aminosäuren:

5 A: Alanin

C: Cystein

D: Asparaginsäure

E: Glutaminsäure

F: Phenylalanin

10 G: Glycin

H: Histidin

I: Isoleucin

K: Lysin

L: Leucin

15 M: Methionin

N: Asparagin

P: Prolin

Q: Glutamin

R: Arginin

20 S: Serin

T: Threonin

V: Valin

W: Tryptophan

Y: Tyrosin

4. Literatur

- 1. Wüthrich B. Allergy and Clin Immunol News 3, 41 (1991).
- Miyamoto, T., Advances in Allergology and Clinical Immunology.
 Eds. Ph Godard, J. Bousquet, F.B. Michel. EAACI Congress Paris, 10-15
 May 1992, The Parthenon Publishing Group, Casterton Hall U.K., New
 Jersey, U.S.A. p. 343.
 - 3. Jarolim E., Rumpold, H., Endler, A.T., et al. Allergy 44, 385 (1989).
- 4. Roitt, I., Essential Immunology. 6th Edition 1991.
 - Parronchi, P., Macchia, D., Piccini, M.P., et al. Proc. Natl. Acad.
 Sci.U.S.A. 88, 4538 (1991).
 - 6.Schwartz, R. H. Ann. Rev. Immunol. 3, 237 (1985).
 - 7. Bousquet, J., Becker W.M., Hejjaoudi, A., et al. J Allergy Clin
- 15 Immunol 88, 43 (1991).
 - 8. Birkner, T., Rumpold H., Jarolim, E., et al. Allergy 45, 418 (1990).
 - 9. Rothbard, J.B., Gefter, M.L., Ann Rev Immunol 9, 527 (1991).
 - 10. Valenta, R., Breiteneder H., Pettenburger K., et al. J Allergy Clin Immunol 87,677 (1991).

20

25

Patentansprüche

1. Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der Ordnung Fagales insbesondere von Birken, Haseln und Erlen, dadurch gekennzeichnet, daß sie T Zellklone oder T Zellinien, die von gegen Pollen der Ordnung Fagales allergischen Patienten stammen, allergenspezifisch stimulieren oder blockieren, das heißt zur Toleranz (Anergie) dieser T Zellen führen, und wenigstens 10 eines der aus der folgenden Gruppe ausgewählten Peptide:

GVFNYETETTSVIPAA

ITSVIPAARLFKAFIL

DNLFPKVAPQAISSVE

PQAISSVENIEGNE

15 GFPFKYVKDRVDEVDHTN

DHTNFKYNYSVIEGGP

YSVIEGGPIGDTLEKI

DTLEKISNEIKIVATPDG

GSILKISNKYHTKGDH

20 ETLLRAVESYLLAHSDAYN

aufweisen, bzw. Peptide, die zu den genannten Peptiden kreuzreaktive Eigenschaften zeigen.

- Molekülfragmente nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zu den
 angeführten Molekülfragmenten eine hohe Homologie, insbesondere über 75% besitzen.
- 3. Molekülfragmente nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zu den angeführten Peptiden eine hohe Homologie, insbesondere über 75%, besitzen, in 30 vitro und in vivo zu einer T Zell Toleranz führen können und sich daher zur Diagnostik und Therapie allergischer Erkrankungen eignen.

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5:

C12N 15/29, A61K 39/36

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 94/10194

G01N 33/53

(43) Internationales Veröffeatlichungsdatum:

11. Mai 1994 (11.05.94)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/AT93/00163

A3

(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1993 (25.10.93)

(30) Prioritätsdaten:

A 2125/92 A 43/93

27. Oktober 1992 (27.10.92)

AT 14. Januar 1993 (14.01.93)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-MAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELL-SCHAFT M.B.H.[AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EBNER, Christof [AT/ AT]; St. Elisabethplatz 4/13, A-1040 Wien (AT). FER-REIRA, Fatima [BR/AT]; De Quergasse 6/3, A-1170 Wien (AT). SCHENK, Siegfried [AT/AT]; Schönlaterngasse 8/33, A-1010 Wien (AT). SZEPFALUSI, Zsolt [AT/AT]; Gaullachergasse 10, A-1160 Wien (AT). VA-LENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT). BREITENBACH, Michael [AT/AT]; Helfertgasse 44, A-1120 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). RUMPOLD, Helmut [AT/AT]; Buchleitengasse 8/3, A-1180 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Hohe Wandstrasse 40, A-2364 Marianenzersdorf (AT).

(74) Anwälte: ITZE, Peter usw.; Amerlingstr. 8, A-1061 Wien

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen einweffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 1. September 1994 (01.09.94)

(54) Title: MOLECULE FRAGMENTS (PEPTIDES) OF THE MAIN ALLERGENS CONTAINED IN THE POLLEN OF TREES OF THE FAGALES ORDER

(54) Bezeichnung: MOLEKÜLFRAGMENTE (PEPTIDE) DER HAUPTALLERGENE DER POLLEN VON BÄUMEN DER ORDNUNG FAGALES

(57) Abstract

The invention concerns the T-cell epitope of a 17 kD protein present as the main allergen contained in the pollen of trees of the Fagales order, in particular birches, hazels and alders, or generated by genetic engineering as a recombinant protein. Because of the high degree of affinity between said trees, their respective 17 kD proteins are also highly homologous. These proteins are designed as Bet v I, Cor a I and Aln g I in the international literature and cause tree pollen allergies in predisposed persons (allergic patients). The peptides derived from the main allergens (major allergens), in particular Bet v I, are suitable for diagnosing tree pollen allergy and are capable of stimulating (causing the proliferation, the cytokine production) or blocking T-cells of the patients in vitro and in vivo in an allergen-specific manner, or to provoke tolerance to the allergen specific T-cells.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf T Zell Epitope eines 17 kD Proteins, das als Hauptallergen der Baumpollen der Order Fagales, insbesondere Birke, Hasel und Erle in der Natur vorkommt oder auf gentechnologischem Wege als rekombinantes Protein erzeugt wird. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der genannten Bäume besteht eine hohe Homologie auch der jeweiligen 17 kD Proteine, die gemäß der internationalen Literatur als Bet v I, Cor a I und Aln g I bezeichnet werden und in disponierten Personen (Allergikern) Baumpollenallergien hervorrufen. Die von den Hauptallergenen (major allergens), insbesondere Bet v I abgeleiteten Peptide eignen sich für die Diagnose der Baumpollenallergie und sind imstande T Zellen der Patienten in vitro wie in vivo allergen-spezifisch zu stimulieren (Proliferation, Zytokinproduktion) oder zu blockieren bzw. zu einer Toleranz der allergenspezifischen T Zellen zu führen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	CB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	CE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinca	NŁ	Niederlande
BF	Burkina Faso	CR	Griechenland	NO	Norwegen
BC	Bulgarien	Hυ	Ungarn	NZ	Neusceland
BJ	Benin	16	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IΤ	Italien	PŤ	Portugal
BY	Bularus	JP	Japan	RO	Rumānien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KC	Kirgisistan	SD	Sudan
CC	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtunstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
cs	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DΕ	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
PR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Interr 121 Application No PCT/AT 93/00163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C12N15/29 A61K39 A61K39/36 G01N33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC **B. FIELDS SEARCHED** Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 C12N A61K C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. X WO, A, 92 02621 (BIOMAY BIOTECHNIK 1-3 PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H.) 20 February 1992 see page 4, line 12 - page 5, line 27; claim 3 X INT.ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED 1-3 IMMUNOLOGY. vol.89, no.4, 1989 page 410-415 S.ELSAYED ET AL. 'Synthetic allergenic epitopes from the amino-terminal regions of the major allergens of hazel and birch pollen' see figure 2 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex. Special categories of cited documents: "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not connidered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed inver filing date cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person shilled "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report 03.08.94 2 May 1994 Name and mailing address of the ISA Authorized officer European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016 CUPIDO, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

		PCT/AT 93/00163	
C.(Continu	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
A	EMBO JOURNAL., vol.8, no.7, July 1989, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1935 - 1938 H.BREITENEDER ET AL. 'The gene coding for the major birch pollen allergen BetvI, is highly homologous to a pea disease resistance response gene' see figure 1		1-3

International application No. PCT/AT 93/00163

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This inte	ernational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1.	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)
This Inte	rnational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
se	e Annex
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
-	
4. X	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
	1-3 (all in part)
Remark	on Protest
	No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No. PCT/AT 93/00163

- 1.- Claims 1-3 (all in part): Peptides with sequences GVFNYETETTSVIPAA and TTSSVIPAARLFKAFIL
- 2.- Claims 1-3 (all in part): Peptides with sequences DNLFPKVAPQAISSVE and PQAISSVENIEGNG.
- 3.- Claims 1-3 (all in part): Peptide with sequence GFPFKYVKDRVDEVDHTN.
 4.- Claims 1-3 (all in part): Peptides with sequences DHTNFKYNNYSVIEGGP and YSVIEGGPIGDTLEKI
- 5.- Claims 1-3 (all in part): Peptid with sequence DTLEKISNEIKIVATPDG.
 6.- Claims 1-3 (all in part): Peptid with sequence GSILKISNKYHTKGDH.
 7.- Claims 1-3 (all in part): Peptid with sequence ETLLRAVESYLLAHSDAYN.

Inten aal Application No PCT/AT 93/00163

	information on patent family member			93/00163
Patent document cited in search report	Publication date	Patent i	amily er(s)	Publication date
WO-A-9202621	20-02-92	AU-A- CA-A- EP-A- JP-T-	0495052 5501656	02-03-92 09-02-92 22-07-92 02-04-93

		·		

Intern ales Aktenzeichen PCT/AT 93/00163

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 5 C12N15/29 A61K39/36 G01 G01N33/53 Nach der Internationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 C12N A61K C07K Recherchierte aber meht zum Mindessprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Getrete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evd. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. 1-3 X WO, A, 92 02621 (BIOMAY BIOTECHNIK PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H.) 20. Februar 1992 siehe Seite 4, Zeile 12 - Seite 5, Zeile 27; Anspruch 3 X INT.ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED 1-3 IMMUNOLOGY. Bd.89, Nr.4, 1989 Seite 410-415 S.ELSAYED ET AL. 'Synthetic allergenic epitopes from the amino-terminal regions of the major allergens of hazel and birch pollen' siehe Abbildung 2 X Siehe Anhang Patentfamilie Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung die beanspruchte Erfindu kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einem Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie Veröffentlichung von besonderer Bedeutung die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategone in Verbindung gebracht wird und diese Verhandung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem ansatzt ausgeführt)

O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedanum, aber nach

Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedanum, aber nach

Veröffentlichung, die Witglied derselben Patentfamilie ist Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 03 08 94 2. Mai 1994 Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Bevollmächtigter Bediensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 CUPIDO, M

Intern wies Aktenzeichen
PCT/AT 93/00163

	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommen	den Tale Betr. Anspruch Nr.
gone,	pezeichnung der Verditentutchung, soweit erforderuch unter Angabe der in betracht kommen	Series Company (1)
	EMBO JOURNAL., Bd.8, Nr.7, Juli 1989, EYNSHAM, OXFORD GB Seiten 1935 - 1938 H.BREITENEDER ET AL. 'The gene coding for the major birch pollen allergen BetvI, is highly homologous to a pea disease resistance response gene' siehe Abbildung 1	1-3

iternationales Aktenzeichen

PCT/AT93/00163

Feld I	Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt 1)
Gemäß	Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. 🗌	Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2.	Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
	Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II	Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
sie	the anhang
	Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
	Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
— i	Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser nternationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
	Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen eraßet. 1-3 (alle teilweise)
Bemerkun	gen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

- 1.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptide mit den Sequenzen GVFNYETETTSVIPAA und TTSSVIPAARLFKAFIL
- 2.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptide mit den Sequenzen DNLFPKVAPQAISSVE und PQAISSVENIEGNG.
- 3.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptid mit der Sequenz GFPFKYVKDRVDEVDHTN.
- 4.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptide mit den Sequenzen DHTNFKYNNYSVIEGGP und YSVIEGGPIGDTLEKI
- 5.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptid mit der Sequenz DTLEKISNEIKIVATPDG
- 6.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptid mit der Sequenz GSILKISNKYHTKGDH.
- 7.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptid mit der Sequenz ETLLRAVESYLLAHSDAYN.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	chenbericht Datum der Mitg ktentdokument Veröffentlichung Pat		(er) der familie	Datum der Veröffentlichung 02-03-92 09-02-92 22-07-92 02-04-93	
WO-A-9202621	20-02-92	AU-A- 8311291 CA-A- 2067144 EP-A- 0495052 JP-T- 5501656			
•					